

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平4-148685

⑪ Int. Cl.⁹

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)5月21日

C 12 N 15/74
 //(C 12 N 15/74
 C 12 R 1:01)

8717-4B C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全3頁)

⑭ 発明の名称 環状プラスミド

⑮ 特 願 平2-270377

⑯ 出 願 平2(1990)10月11日

⑰ 発 明 者 湯 不 二 夫 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日東化学工業株式
 会社中央研究所内
 ⑰ 発 明 者 橋 本 好 弘 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日東化学工業株式
 会社中央研究所内
 ⑰ 出 願 人 日東化学工業株式会社 東京都千代田区丸の内1丁目5番1号

明 細 書

1. 発明の名称

環状プラスミド

2. 特許請求の範囲

1. 大きさが約2.6kbであり、制限酵素切断部位数が Sac I : 2、Bam H I : 1、Pvu II : 1、Sca I : 1、Sph I : 1および Xho I : 1であることを特徴とする *Rhodococcus* 属に属する微生物由来の環状プラスミド。

2. 微生物が *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 4276、ATCC 14349およびATCC 14348である請求項

2記載の環状プラスミド

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は新規なプラスミドに関し、さらに詳しくは *Rhodococcus* 属に属する微生物に由来する新規な環状プラスミドに関する。

(従来の技術と問題点)

Rhodococcus 属に属する微生物は、ニトリル類

を水和して対応するアミド類を生産するための微生物触媒として知られており、また *Rhodococcus rhodochrous* 種に属する微生物が極めて高性能のニトリル水和活性を有することが知られている。このような状況下、*Rhodococcus* 属の宿主-ベクター系の開発が以前から期待されていた。しかしながら、*Rhodococcus* 属に属する菌株についてはこれらの微生物を宿主とするに適したベクターの開発は遅れており、*Rhodococcus* 属においてプラスミドの見いだされた株は *Rhodococcus* sp. H13-A株(J. Bacteriol. 170, 683-645 (1988))をはじめ僅か数株にすぎない。そのため、さらに、*Rhodococcus* 属に属する菌株から工業的に利用し得る微生物を育種、改良するための新しいベクターの開発が強く要望される。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは *Rhodococcus* 属に属する菌株を用いて工業的に有用な宿主-ベクター系を開発すべく鋭意研究を行った結果、該属に属する微生物から工業的に有用な宿主-ベクター系におけるベク

ターとして利用可能な新規な環状プラスミドを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、大きさが約2.6kbであり、制限酵素切断部位数が *Sac*I : 2、*Bam*H I : 1、*Pvu*II : 1、*Sca*I : 1、*Sph*I : 1 および *Xho*I : 1 であることを特徴とする、*Rhodococcus* 属に属する微生物由来の環状プラスミドである。

本発明の環状プラスミドは、具体的には、例えば *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 4276、ATCC 14349 および ATCC 14348 から得ることができ、いずれも、大きさが約2.6kb で且つ下記第1表に示す制限酵素に対する分解特性を有する新規な環状プラスミドである。以下これらのプラスミドを、それぞれ、pRC001、pRC002、pRC003 と称する。

これに 0.6ml の 0.5M EDTA、2.4ml の 5M NaCl、4.4 ml の 4% SDS-0.7M NaCl を順次加え、緩やかに混合し氷上で18時間静置する。4℃にて65,000xg で1時間遠心し上清を得、これに 50% ポリエチレングリコール (MW=6,000) を 4.6ml 加える。氷上で3時間静置し、1,000xg で5分遠心する。沈殿物を 5ml の TE 緩衝液に溶解し、CsCl を 7.5g、1.5 mg/ml 臭化エチジウム-TE 緩衝液を 2ml 加え混合した。この溶液を 42 時間 130,000xg の密度勾配遠心分離にかけた。

紫外線照射により検出されたプラスミド画分を分取した後、n-ブタノールで処理し臭化エチジウムを除いた。TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH 8)、1mM EDTA) に対して透析後、エタノール沈殿により精製プラスミド画分を得た。これを 0.7% アガロースゲル電気泳動に供し、ゲルを臭化エチジウムで染色することによりプラスミドの存在を確認した。

(2) プラスミドの分子量測定

上記のように調製したプラスミドの一部を 0.7%

第1表

制限酵素	切断部位数	生成断片のサイズ (kb)
<i>Sac</i> I	2	2.3, 0.3
<i>Bam</i> H I	1	2.6
<i>Pvu</i> II	1	2.6
<i>Sca</i> I	1	2.6
<i>Sph</i> I	1	2.6
<i>Xho</i> I	1	2.6

次に本発明の実施例を示す。

実施例1

(1) プラスミドの分離精製

Rhodococcus rhodochrous ATCC 4276、ATCC 14349 および ATCC 14348 を、それぞれ 400ml の MY 培地 (ポリペプトン 0.5%、バクトイーストエキス 0.3%、マルツエキス 0.3%、グルコース 1%) にて培養を開始する。OD₆₆₀ = 0.15~0.2 の頃にペニシリン G 0.5U/ml を加える。OD₆₆₀ = 1.0 まで培養後、遠心により菌体を回収する。菌体を 40ml TE S (10mM Tris-HCl (pH 8)、10mM NaCl、1mM EDTA) 緩衝液で洗浄後、11ml の 50mM Tris-HCl (pH 8)/12.5% シュークロース/100mM NaCl/1mg/ml リゾチームに懸濁し、37℃にて3時間振盪する。

アガロースゲル電気泳動に供した。この際、サイズマーカーとして大腸菌プラスミド pUC18、pUC118、pBR322 (各々 2.69kb、3.16kb、4.36kb) を同時に泳動した。*Rhodococcus rhodochrous* ATCC 4276、ATCC 14349 および ATCC 14348 から得られたプラスミドは、それぞれ pRC001、pRC002 および pRC003 と命名され、アガロースゲル電気泳動から求められた大きさは、すべて約 2.6kb であった。

(3) 各種制限酵素による切断特性

上記のように調製したプラスミドの一部を各種制限酵素と反応させ、反応終了後、反応液を 0.7% アガロースゲル電気泳動および 5% アクリルアミドゲル電気泳動により分析した。サイズマーカーとしてはラムダファージ DNA の *Hind*III 消化物および *Pst*I 消化物を用い、プラスミドの各制限酵素断片のサイズを算出した。pRC001、pRC002 および pRC003 は第2表に示すような同一の制限酵素切断特性を示した。

第 2 表

制限酵素	切断部位数	生成断片のサイズ (kb)
S a c I	2	2.3, 0.3
B a m H I	1	2.6
P v u II	1	2.6
S c a I	1	2.6
S p h I	1	2.6
X h o I	1	2.6
E c o R I	0	—
H i n d II	0	—
K p n I	0	—

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は、本発明のプラスミド pRC001、pRC002 および pRC003 の制限酵素切断地図である。

特許出願人

日東化学工業株式会社

第 1 図

